

Szakmai beszámoló

Projektünk célja olyan új ismeretek megszerzése volt, amelyek lényegesen hozzájárulhatnak a növények növekedésének és egyedfejlődésének szabályozása szempontjából fontos brasszinoszteroid (BR) hormoncsalád bioszintézisének pontos felderítéséhez. Ezen belül:

- meg kívántuk határozni a bioszintézisben meghatározó jelentőségű *CYP90* és *CYP85* gének kifejeződésének fejlődési stádiumtól függő és szervspecifikus szabályozását, valamint ennek hatását az endogén hormonszint alakulására,
- a transzkripció szintű kontroll élettani jelentőségének megismerése céljából terveztük kideríteni a szintézisútban kulcsszerepet játszó *CYP90A1* enzim *in vivo* stabilitását,
- meg akartuk határozni a bioszintézis sebességhatározó lépéseit felelős enzimek génjeinek napszakos regulációjáért felelős endogén és környezeti tényezőket, továbbá
- molekuláris genetikai módszerekkel azonosítani akartuk az ismeretlen funkciójú *CYP90C1* és *CYP90D1* enzimek funkcióját a BR bioszintézis folyamatában.

A bioszintézisben résztvevő enzimek génjei esetében direkt mRNS analitikai módszerekkel megállapítottuk, hogy kifejeződésük összetett, elsődlegesen transzkripció szintű reguláció alatt áll. Az általunk már korábban leírt végtermékgátlás mellett valamennyi gén esetében jellegzetes stádium- és szervspecifikus szabályozást tapasztaltunk. Bár munkánk során az *Arabidopsis* modellnövény valamennyi *CYP90* és *CYP85* génjének kifejeződését nyomon követtük, részletes vizsgálatainkat elsősorban a *CPD/CYP90A1* és *CYP85A2* gének működésének megismerésére összpontosítottuk, mivel előbbi a bioszintézis egy kulcsfontosságú korai lépését katalizálja, míg utóbbi közvetlenül felelős a bioaktív hormon létrehozásáért. Az egyes BR intermedierek megoszlása a gyökérzetben és a föld feletti fotoszintetikus szervek közt szoros korrelációt mutatott a *CYP90A1* és *CYP85A2* ezen részekben mutatott expressziós különbségeivel, valószínűsítve ezáltal a transzkripció kontroll meghatározó voltát a hormonszint szabályozásában. Mindez összhangban áll azzal az általunk is leírt jelenséggel, hogy a növényekben a BR transzportja rendkívül korlátozott, és a lokális hormonszint kialakításában nagy jelentősége van a *de novo* bioszintetikus folyamatoknak. A *CYP85A* gének aktivitását ripotergénnel követve felismertük a lokális BR szintézis jelentőségét az *Arabidopsis* és paradicsom reproduktív szerveinek kialakulása során. Kimutattuk, hogy a legaktívabb BR formának tekinthető, korábban a paradicsomból hiányzóknak vélt brasszínolid igen nagy mennyiségben szintetizálódik a bogyóérés korai stádiumában, míg mennyisége a vegetatív szervekben végig a kimutathatósági szint alatt marad.

A *CPD/CYP90A1* gén összetett transzkripció szabályozása arra utalt, hogy ezen folyamatok fontosak az általa kódolt enzim szintjének és aktivitásának beállításában. Mivel ez esetben a *CYP90A1* mennyiségének rugalmasan követnie kellene az mRNS szint változásait, erre csak akkor van lehetőség, ha féléletideje nem lényegesen hosszabb a *CPD* transzkriptuménál. Az mRNS stabilitását transzkripció gátlók jelenlétében meghatározva a féléletidő másfél-két órának adódott. Mivel a *CYP90A1* protein immunológiai detektálását a többi *CYP90* enzimmel létrejövő esetleges keresztreakciók zavarhatták volna, a stabilitás meghatározásához olyan teljes *CYP90A1* aktivitást mutató kimérés enzimet használtunk, amely C-terminális végén luciferáz riporter részt is hordoz. A fúziós protein életidejét proteinszintézis gátló jelenlétében, luciferáz-specifikus ellenanyag felhasználásával határoztuk meg. A méréseink alapján kalkulált közel kétórás felezési idő elegendően rövidnek bizonyult ahhoz, hogy az enzim szintje hűen követhesse a transzkriptum mennyiségi változásait, megerősítve azt a várakozást, hogy a transzkripció szabályozás érdemben befolyásolhatja a BR bioszintézis ezen kulcsenzimének aktuális hozzáférhetőségét, és ezáltal magát a szintézisút hatékonyságát is.

Mivel a BR-oknak fontos szerepük van a korai fotomorfogenikus fejlődés során, nem volt meglepő, hogy a hormon szintézisében meghatározó *CYP90A1* és *CYP85A2* gének kifejeződése napszakosan is szabályozottnak bizonyult. Mindkét gén esetében a normális napi fény és sötét periódusok mellett két maximumot és két minimumot mutató diurnális expressziós profilt észleltünk. Kimutattuk, hogy ezt alapvetően egy kb. 24 órás cirkadián oszcilláció, és az erre ráépülő pozitív fényszabályozás határozza meg. A fényhatásért elsődlegesen felelős lehetséges szignálut(ak)at monokromatikus fényforrások, ill. az egyes fotoreceptorokra nézve deficiens mutánsok felhasználásával igyekeztünk azonosítani. Mivel a vörös fény önmagában elégségesnek bizonyult a fényszabályozáshoz, és fitokróm B hiányában a fényindukció elmaradt, megállapíthattuk, hogy a fényhatás közvetítéséért elsődlegesen a fitokróm B-ről kiinduló szignálátviteli lánc a felelős. BR-inszenzitív mutáns háttér felhasználásával azt is tisztáztuk, hogy a diurnális kifejeződési profil alapvetően független a BR bioszintetikus gének expresszióját egyébként stringensen befolyásoló hormonális végtermékszabályozástól. A hormontartalom napi változásainak analízise során a más időpontokban kimutathatatlan brasszinolid erős felhalmozódását tapasztaltuk a fényperiódusok közepén. Bár e jelenségben a bioszintetikus gének diurnális regulációjának szerepe közvetlenül még nem bizonyított, mindazonáltal a brasszinolid szintjének emelkedése összhangban áll a szintéziséért felelős *CYP85A2* expressziójának indukciójával a fényszakaszok során.

A BR bioszintézisben résztvevő, de munkánk megkezdésekor még ismeretlen funkciójú *CYP90C1* és *CYP90D1* enzimek karakterizálása céljából az ezek génjeit érintő nullmutáns *Arabidopsis* vonalakat izoláltunk. Bár mind a *cyp90c1*, mind a *cyp90d1* esetében csak igen enyhe fenotípust észleltünk, az ezek keresztezésével előállított *cyp90c1cyp90d1* dupla mutáns jelegzetes BR-deficiens törpe megjelenésű volt. Ez arra utalt, hogy *CYP90C1* és *CYP90D1* gének redundáns funkciójú P450-eket kódolnak. Az enzimatiszta szerep megállapítására végzett intermedier-specifikus mutáns menekítési kísérletek és endogén intermedier analízisek végzése során értesültünk arról, hogy Dr. Masaharu Mizutani laboratóriumában (Kyotoi Egyetem) ugyancsak a *CYP90C1* és *CYP90D1* reakcióinak meghatározásán dolgoznak heterológ rendszerben kifejeztetett enzimek biokémiai vizsgálatával. Csoportjaink munkáját összehangolva tisztáztuk, hogy a *CYP90C1* és *CYP90D1* valóban redundáns funkciójú enzimek, melyek a BR bioszintézis során többféle intermedier szteroid oldalláncának C-23 helyzetű hidroxilációját végzik. A kyotoi laboratórium enzimológiai analízisei nyomán ismertté vált a két enzimnek az egyes szubsztrátokkal szembeni affinitása, és világossá vált, hogy ez az oxidatív lépés a korábban feltételezett anyagcsereúttól eltérő módon, már a bioszintézis korai stádiumában bekövetkezik. A várt reakciótermékeknek a *cyp90c1cyp90d1* kettős mutánsra gyakorolt fenotípus menekítő hatásának mérésével igazolni tudtuk ezt az új bioszintézis modellt, melyben a 23-hidroxilált intermediereken keresztül a korábban feltételezettnél hárommal kevesebb lépésben (ún. C-23 söntön keresztül) jön létre a végtermék brasszinolid.

A támogatott projekt keretében végzett munkánk során a célul kitűzött valamennyi lényeges feladatot teljesítettük. Eredményeinket - az OTKA támogatás feltüntetésével - rangos nemzetközi folyóiratokban megjelent (összesen több mint 40 IF értékű) közleményben adtuk közre. Munkánk során fontosnak éreztük, hogy részünkről maradéktalanul teljesítsük az eredeti támogatási szerződésben vállalt feladatainkat, annak ellenére, hogy a projekt futamideje alatt a támogatási összeget az OTKA Bizottság szerződésmódosítással csökkentette.